

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Mai 2003 (30.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/044224 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, B01J 19/00, G01N 33/50 (74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstr. 17, 80336 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13606 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 22. November 2001 (22.11.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ADNAGEN AG [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Hannover-Langenhagen (DE).
- (72) Erfinder; und (73) Erfinder/Anmelder (nur für US): TAMAK, Cengiz [DE/DE]; Am Gehrkamp 1, 31275 Lehrte (DE). KREHAN, Alf-Andreas [DE/DE]; Schönefelder Str. 5, 30853 Langenhagen (DE). STEFFENS, Pia [DE/DE]; Bäckkamp 29, 30900 Wedemark (DE). WASCHÜTZ, Stefanie [DE/DE]; Mühlenweg 11, 29227 Celle (DE). ZIEGLSCHMID, Veit [DE/DE]; Lohmeyerhof 11, 30459 Hanover (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DIAGNOSIS KIT, DNA CHIP, AND METHODS FOR DIAGNOSING OR SUPERVISING THE TREATMENT OF TESTICULAR CANCER

(54) Bezeichnung: DIAGNOSE-KIT, DNS-CHIP SOWIE VERFAHREN ZUR DIAGNOSTIK ODER BEHANDLUNGSKONTROLLE BEI HODENKREBS

(57) Abstract: The invention relates to a diagnosis kit, a DNA chip, and to methods for diagnosing or supervising the treatment of testicular cancer, which are of greatest importance, in particular, within the scope of cancer prevention and post-treatment. The invention is essentially characterized in that the mRNA of testicular tumor markers is detected in a blood sample, whereby the tumor markers depict a tumor-associated gene expression. To this end, particularly β -hCG, AFP, PLAP or GCAP come into question. The detection of the mRNA is carried out by reverse transcription in cDNA and by subsequently amplifying selected segments of the cDNA by means of polymerase chain reaction.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Diagnose-Kit, ein DNS-Chip sowie Verfahren zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle bei Hodenkrebs, wie sie insbesondere im Rahmen der Krebsvor- und -nachsorge von grösster Wichtigkeit sind. Die vorliegende Erfindung beruht dabei im wesentlichen darauf, dass die mRNS von Hodentumormarkern in einer Blutprobe nachgewiesen wird, wobei die Tumormarker eine tumorassoziierte Genexpression darstellen. Hierfür kommen insbesondere PLAP oder GCAP in Frage. Der Nachweis der mRNS erfolgt durch reverse Transkription in cDNS und anschliessende Amplifikation ausgewählter Abschnitte der cDNS mittels Polymerasekettenreaktion.

WO 03/044224 A1

Diagnose-Kit, DNS-Chip sowie Verfahren zur Diagnostik
oder Behandlungskontrolle bei Hodenkrebs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Diagnose-Kit,
5 einen DNS-Chip sowie ein Verfahren zur Diagnostik
 () oder Behandlungskontrolle bei Hodenkrebs. Im Rahmen
 der Krebsvor- und -nachsorge ist es von großer Wich-
 tigkeit, maligne Hodentumore bzw. rezidive maligne
 Hodentumore anhand des Auftretens metastasierender
10 Tumorzellen im Blut frühzeitig nachweisen zu können.

Hodenkrebs ist für weniger als 2% aller bösartigen
Neubildungen von Tumoren beim Mann verantwortlich.
Allerdings handelt es sich bei 20-30% aller Krebser-
15 krankungen unter 40jähriger Männer um Hodenkrebs. Die
 Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beispielsweise in
 der Bundesrepublik Deutschland beträgt ca. 3600, wo-
 bei ca. 240 Männer an Hodenkrebs sterben. Die höchste
 Inzidenz findet man dabei zwischen dem 25. und 40.
20 Lebensjahr. Durch den Fortschritt in der onkologi-

schen Therapie können heute über 90% aller Betroffenen langfristig geheilt werden. Die hohen Überlebensraten begründen sich dabei in der ausgeprägten Wirksamkeit der cis-Platin-basierenden Chemotherapien.

5

Dabei gilt es, im klinischen Stadium 1 der Erkrankung zu entscheiden, ob der Patient mit einer Chemotherapie und/oder mit einer Operation belastet werden muß, um einen dauerhaften Heilungserfolg zu erzielen. Eine große Anzahl von Patienten wird dabei chemotherapeutisch behandelt, obwohl kein gesicherter Nachweis einer Metastasierung vorliegt. In den Konzepten, die auf einer reinen Überwachung aufbauen, kommt es jedoch in 25% der Fälle zu Rezidiven mit zum Teil tödlichem Ausgang.

10

15

20

25

Bei den derzeit angewandten Untersuchungsmethoden werden bei Krebspatienten sogenannte Tumormarker auf Proteinebene (immunologisch bzw. enzymatisch) quantitativ im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten ermittelt. Diese Nachweisverfahren sind jedoch für die Tumordiagnostik bzw. Behandlungskontrolle/Nachsorge bei Hodentumor nur bedingt geeignet, da erhöhte Tumormarkerwerte in Körperflüssigkeiten auch durch nichttumoröse Erkrankungen, wie beispielsweise Entzündungen des Magen-Darm-Traktes, Leberzirrhose, Virusinfekte oder starkes Rauchen hervorgerufen werden können.

30

Molekulargenetische Verfahren erscheinen hier für den Nachweis von Tumorzellen im peripheren Blut hilfreich, da am Beginn des Metastasierungsprozesses der Übertritt von Tumorzellen ins venöse Blut stehen kann.

35

Die EP 0 520 794 B1 offenbart ein derartiges Verfahren, bei dem Metastasierungen in Körpergeweben oder Flüssigkeiten erfaßt werden. Dabei werden Nukleinsäuren erfaßt, beispielsweise mittels Vervielfältigung durch Polymerase-Kettenreaktion. Das Verfahren beruht nun entscheidend darauf, daß die nachgewiesene Nukleinsäuresequenz in Zellen des Herkunftsgewebes eines Tumors exprimiert wird, d.h. in Tumorzellen und marker- abhängig auch in den gesunden Zellen des Herkunftsgewebes. Weitere Bedingung ist, daß diese Sequenz jedoch nicht in denjenigen Zellen exprimiert wird, deren Gewebe untersucht wird. Wird also eine entsprechende Sequenz in der untersuchten Probe gefunden, so muß diese von verschleppten, d.h. metastasierenden Zellen eines ortsfremden Tumors herrühren. Damit beruht dieses Verfahren letztlich auf dem Nachweis von Zellen, die in der Blutprobe von gesunden Personen nicht vorkommen sollten.

Insgesamt ist festzustellen, daß die derzeit verwendeten diagnostischen Methoden zu ungenau sind, wenn es um die Beurteilung der malignen Potenz von Resttumoren nach durchgeführter Chemotherapie in den metastasierenden Stadien geht. Es gilt also weiterhin, Nachweise für eine okkulte bzw. restliche Metastasierung zu finden, die eine rechtzeitige Einordnung in die vielfältigen primär kurativen therapeutischen Optionen zulassen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren, ein Diagnose-Kit sowie einen Nukleinsäure-Mikroarray zur Verfügung zu stellen, mit denen Tumorzellen bei Hodentumorerkrankungen im peripheren Blut nachgewiesen werden können.

Diese Aufgabe wird durch das Diagnose-Kit nach Anspruch 1, den Mikroarray nach Anspruch 20 sowie das Verfahren nach Anspruch 22 und deren Verwendung nach Anspruch 45 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Diagnose-Kits, Mikroarrays, Verfahrens oder der Verwendungen werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

Die vorliegende Erfindung beruht im wesentlichen darauf, daß nicht etwa auf immunologischer oder enzymatischer Ebene Hodentumormarker im Blut von Patienten nachgewiesen werden, sondern daß die mRNS (Messenger-Ribonukleinsäure) von Hodentumormarkern in einer Blutprobe nachgewiesen wird, wobei die Tumormarker eine tumorassoziierte Genexpression darstellen. Als Marker für Hodentumoren werden erfindungsgemäß die Plazenta-spezifische alkalische Phosphatase (PLAP) und die Keimzell-spezifische alkalische Phosphatase (GCAP), die bei Hodentumoren exprimiert werden, das epitheliale Glycoprotein (GA733_2 oder EGP40), das high-mobility group protein Isoform I-C (HMGI-C) sowie der Gastrin freisetzendes Peptid-Rezeptor (GRPR) erfaßt. Der Nachweis kann dabei für nur einen der Marker oder auch für eine beliebige Anzahl dieser vier Hodentumorenmarker in Kombination miteinander durchgeführt werden, wobei jedoch zumindest ein Nachweis der mRNA der Marker GA733.2 und/oder GCAP/PLAP erfolgt. Das erfindungsgemäße Kit kann daher Oligonukleotidpaare für nur einen oder eine beliebige Auswahl oder auch alle der vier Hodentumormarker enthalten.

Dadurch werden alle diejenigen Fälle nicht erfaßt, bei denen beispielsweise aufgrund von anderen Krankheiten ebenfalls die Hodentumormarker im Ursprungsgewebe exprimiert und als Protein in die Blutbahn ge-

langen. Es werden folglich lediglich Zellen erfaßt, die zum einen sich selbst in der Blutprobe befinden und zum anderen den jeweiligen Hodentumormarker exprimieren. Dabei handelt es sich folglich um Tumorzellen, die aus ihrem ursprünglichen Hodentumorgewebe stammen und in das Blut der Patienten verschleppt wurden. Da im Blut nicht an einem Hodentumor Erkrankter die mRNA der untersuchten Marker nicht exprimiert wird, zeigt sich eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten der zugehörigen mRNA und einer Metastasierung schon im frühen Stadium im Metastasierungsprozeß.

Vorteilhafterweise wird nicht nur die mRNS eines einzelnen Hodentumormarkers erfaßt sondern eine Kombination von Markern untersucht. Dadurch ist es möglich, beispielsweise alle Hodenkrebsformen über ihre im Blut metastasierenden Zellen erfassen zu können. Dies bedeutet, daß sowohl seminöse als auch nichtseminöse Hodenkrebsformen bzw. auch Mischtumore mit Anteilen eines Seminoms und damit 90-95 % aller malignen Tumore des Hodens, nämlich sämtliche Keimzelltumoren, erfaßt werden.

Da einzelne Marker in therapieabhängiger Weise unterschiedlich exprimiert werden, ist es vorteilhaft, eine Kombination von Tumormarkern zu untersuchen, um alle im Blut zirkulierenden Tumorzellen zu erfassen. Hierdurch lassen sich Tumorzellen auch dann erkennen, wenn die Expression eines bestimmten Markers bei einem Patienten bzw. in einem Krankheitsstadium relativ gering ist, was sonst zu einem vermeintlich negativen Ergebnis führen könnte. Die Verwendung weiterer Marker stößt jedoch meist deswegen auf Grenzen, weil mononukleäre Blutzellen eine Hintergrundexpression („illegitime Transkription“) aufweisen, die eine ex-

akte Analyse behindern.

Für die Erkennung von Hodenzellen wird daher erfindungsgemäß die folgende Kombination aus Markern vorgeschlagen:

- GA733.2
- GCAP/PLAP
- HMGI-C
- GRPR,

wobei GA733.2 und/oder GCAP/PLAP für eine sichere Erkennung von Hodentumorzellen obligatorisch erfaßt werden müssen.

Bei der Anwendung von RT-PCR-Systemen zum Nachweis von Tumorzellen ist aufgrund der sehr hohen Amplifikationsrate die Spezifität ein kritischer Punkt. Geringste Kontaminationen, etwa durch Fremd-RNA oder untypische Transkription, können hierbei das Ergebnis verfälschen.

() Zentral für die Qualität der als Nachweisbasis isolierten RNS und der daraus synthetisierten cDNS ist die Anreicherung der hierfür verwendeten Zellfraktion aus der verwendeten Blutprobe. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

- a) Anreicherung durch wiederholte Zentrifugation nach Erythrozytenlyse:

1 ml EDTA-Blut werden nach Zugabe von 5 Volumina Erythrozyten-Lysepuffer („QIAmp Blood Kit“, Qiagen; Hilden) für 20 Minuten auf Eis lysiert. Nach Abnehmen des Plasmas/Lysates von den pelletierten Zellen und Resuspension erfolgt eine erneute Zen-

trifugation bei 3000 x g für 20 Minuten. Nach Abnehmen des Überstandes steht die pelletierte Leukozytenfraktion für die RNA-Präparation zur Verfügung.

5

b) Anreicherung durch Dichtegradienten-Zentrifugation:

10

Mittels eines über Zentrifugation erzeugten Dichtegradienten lassen sich Zellen unterschiedlicher mittlerer Volumendichte voneinander trennen. Mononukleare Blutzellen werden mittels eines Ficoll-Hypaque-Gradienten (Pharmacia, Uppsala, Schweden) separiert und anschließend zweifach mit PBS/1% FCS gewaschen.

15

c) Anreicherung mittels Antikörpermarkierung

20

Durch die Verwendung der Immunzytochemie mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumorzellantigene kann eine Steigerung der Spezifität des Tumorzell-Nachweises erzielt werden (Nachweisquote von 1 Tumorzelle auf 10^7 mononukleären Blutzellen). Die Tumorzellen werden dabei mittels spezifischer Antikörper bzw. einer Antikörpermischung von mononukleären Blutzellen getrennt. Die Trennung kann mittels Magnetpartikel (Dynal), an die die Antikörper gebunden werden, erfolgen. Dies wird im folgenden detaillierter beschrieben.

25

30

35

Eukaryontische Zellen tragen eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle an ihrer Zelloberfläche. Entsprechend des Ursprungs und der Funktion der einzelnen Zelle unterscheidet sich die Kombination der exprimierten Oberflächenmoleküle, so daß zelltyp-spezifische Muster entstehen. Zur Erkennung

dieser zelltyp-spezifischen Muster werden Antikörper genutzt. Antikörper binden mit hoher Spezifität an ihr Antigen, hier an ausgewählte Oberflächenmoleküle. Diese Eigenschaft wird genutzt, um
5 Zellen mittels spezifischer Antikörperbindung anhand ihrer Zelltyp-spezifischen Muster zu erkennen und voneinander zu unterscheiden.

Die Expression spezieller Oberflächenproteine unterscheidet Tumorzellen von nichttransformierten Zellen dieses Zelltyps. Da sich dieses spezielle Muster der Oberflächen-Antigene bei Tumorzellen auch von den Blutzell-typischen Mustern unterscheidet, können Tumorzellen im Blut unterschieden werden. Um Tumorzellen zu identifizieren,
10 werden Antikörper, die diese speziellen Oberflächenproteine spezifisch erkennen, als Werkzeuge genutzt. Die spezifische Antikörperbindung wird für verschiedene Analyse- und Separations-Methoden nutzbar gemacht.
15
20

() Aufgrund der intensiven Bindung von speziell dafür selektionierten Immunglobulinen ist neben der Erkennung von Zellen über deren Oberflächenepitope
25 auch eine Separierung der erkannten Zellen von nicht erkannten möglich.

Verschiedene Trennprinzipien sind möglich:

30 1. Trennprinzip beruhend auf Flüssigphase; z. B. Durchflußzytometrie:

Für die durchflußzytometrische Analyse werden Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt.
35 Vereinzelte Zellen werden in einem konstanten Flüssigkeitsstrom einzeln an einer Lichtquelle

(Laser) vorbeigeleitet. Bei Beleuchtung der Zellen werden die an den Antikörpern gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und strahlen Licht bestimmter Wellenlängen ab. Das abgestrahlte Licht wird detektiert und das gemessene Signal digitalisiert gespeichert. Das Lichtsignal kann einzelnen Zellen zugeordnet werden. Die Antikörper-markierte Zelle wird so erkannt und kann nun von anderen Zellen getrennt werden. Zur Trennung werden die Zellen in kleinsten Tropfen vereinzelt. Nach Erkennung der Antikörper-markierten Zelle wird der entsprechende Tropfen in ein Auffangbehältnis gelenkt.

Eine derartige Anreicherung kann beispielsweise durch FACS-Durchflußzytometrie erfolgen. Dabei werden beispielsweise die mononukleären Zellen aus der unter b) angereicherten Fraktion mit fluoreszenzmarkierten mononukleären Antikörpern gegen tumorspezifische Oberflächenproteine inkubiert. Die markierten Zellen werden zweifach mit PBS gewaschen und im Anschluß werden 10^7 Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Für die Isolierung der Tumorzellen wird ein FACS Vantage SE-Durchflußzytometer (Becton Dickinson) verwendet. Über das CellQuest Programm erfolgen Datenaufnahme, Instrumentenkontrolle und Datenauswertung. Die sortierten Zellen werden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (gefüllt mit 1 ml PBS) überführt. Die RNS kann dann wie später beschrieben isoliert werden.

2. Trennprinzip beruhend auf Festphase; z. B. magnetische Separation:

Für die magnetische Separation werden Antikörper mit pseudomagnetischen Partikeln gekoppelt. Nach Einbringen der pseudomagnetischen Partikel in ein Magnetfeld wandern die Partikel im magnetischen Feld. Bei der Bewegung in diesem magnetischen Feld werden Zellen, an die diese gekoppelten Antikörper gebunden sind, mitgerissen und von anderen Zellen getrennt.

Zur Tumorzellenerkennung mittels Magnetpartikel werden folglich an pseudomagnetische Partikel, die eine definierte Anzahl an chemisch aktivierten Stellen auf ihrer Oberfläche besitzen, Antikörper kovalent gekoppelt. Über die Spezifität der Antikörper wird die Spezifität der Trennung bestimmt. Eine Tumorzellen enthaltende Blutprobe wird mit Antikörper-gekoppelte Magnetpartikel versetzt; dann werden Partikel und Blut relativ zueinander bewegt, beispielsweise durch „Überkopf-Rotieren“ in einem geschlossenen Behälter befindlicher Proben oder durch Bewegung der Partikel aufgrund wechselnder Magnetfelder. Jene (Tumor-)Zellen, die von den Festphase-gebundenen Antikörpern erkannt und damit fest gebunden werden, folgen der Bewegung der Partikel. Hierdurch ist es möglich, bei Anlegen eines magnetischen Feldes, die Partikel mit den daran gebundenen Zellen aus dem Blut herauszuziehen (z.B. an die Wand des Trenngefäßes). Das auf diese Weise Tumorzellen-depletierte Blut kann gegen andere Lösungen ausgetauscht werden, wobei die über Magnetpartikel separierten Zellen bis zum Abschalten/Entfernen des Magnetfeldes vor Ort verbleiben und für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen.

Vorteilhafterweise können für die Erkennung der Tumorzellen spezifische Antikörper-Mischungen verwendet werden, die entweder allgemein auf Tumorzellen oder auch spezifisch für Hodenzellen-Erkennung optimiert sind. Beispielsweise eignet sich zur Erkennung von Tumorzellen im Blut eine Kombination der Antikörper MOC-31 und Ber-EP4.

Tabelle A: Antikörper-Mischung 1

Antigen	Klon	Konzentration
Epith.Rel.Antigen	MOC-31 (Fa. Novocastra)	1,25 $\mu\text{l}/10^6$ Zellen
Epitheliales Antigen	Ber-EP 4 (Fa. DAKO)	0,924 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen

Mittels der Antikörpermischung in der vorhergehenden Tabelle A werden ganz allgemein Tumorzellen, jedoch mit hoher Spezifität erfaßt. Dies beruht auf der selektiven Expression bestimmter Oberflächenproteine, die Krebszellen von anderen Zellen unterscheidet.

() Derartige Antikörpermischungen zeigen im Vergleich zu den jeweils separat eingesetzten Antikörpern bei der Zellerkennung und Zelltrennung unabhängig von der angewandten Methode eine erhöhte Sensitivität.

Im folgenden werden einige Beispiele erfindungsgemäßer Verfahren, hierzu verwendeter Diagnose-Kits und dergleichen beschrieben.

Es zeigen:

Fig. 1 den Nachweis von PCR-Produkten mittels Elektrophorese; und

5

Fig. 2 einen weiteren Nachweis von PCR-Produkten mittels Elektrophorese.

10

In einem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird einem Patienten eine Blutprobe entnommen. Aus einem Milliliter dieses Vollblutes (als EDTA-Vollblut) erfolgt eine RNS-Aufarbeitung mit dem QIAampRNA-Blood Mini KitTM (Firma Qiagen, Hilden). Kontaminationen mit genomischer DNS werden durch einen zusätzlichen DNS-Verdau mit dem RNase-Free DNase SetTM, (Firma Qiagen, Hilden) auf der Säule vermieden.

15

20

Alternativ zur oben beschriebenen RNS-Isolierung ist es auch möglich, die isolierte Fraktion mononukleärer Blutkörperchen, wie sie oben beschrieben sind, in TRIzol-Reagenz der Firma Gibco BRL, NY, USA aufzunehmen, zu lysieren und mittels Pipette zu homogenisieren. Anschließend wird die RNS-haltige wäßrige Phase aus einer Chloroform-Extraktion in Isopropanol bei -80°C gefällt. Nach zweimaligem Waschen in 80%igem Ethanol wird das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

25

30

Anschließend wurde die RNS in einem entsprechenden Volumen Wasser zusammen mit Oligo (dT)₁₅-Primern der Firma Promega, Mannheim für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und anschließend direkt auf Eis inkubiert. Es folgte eine cDNS-Synthese bei 37 °C für eine Stunde und eine nachfolgende Inaktivierung der zugegebenen reversen Transkriptase für 5 Minuten bei 93 °C und

35

Abkühlung auf Eis. Die gesamte reverse Transkription wurde mittels des Sensiskript™ Reverse Transkriptase Kit der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt.

- 5 Der Reaktionsansatz für 20 µl für die cDNS-Synthese ist in der nachfolgenden Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Komponenten der cDNS-Synthese

10

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
RNS	x µl	5 ng/µl
10x RT-Puffer	2 µl	1x
dNTP-Mix (je 5 mM)	2 µl	jeweils 0.5 mM
Oligo(dT)-Primer (10 µM)	2 µl	1 µM
Reverse Transkriptase	1 µl	4 U
RNase-Inhibitor	1 µl	0.5 Units/µl
RNase-freies Wasser	ad 20 µl	

- () Im Anschluß an die reverse Transkription wurde eine Multiplex-PCR mit β -Aktin als interner Kontrolle durchgeführt. Der entsprechende Reaktionsansatz geht aus Tabelle 2 im folgenden hervor.
- 15

Tabelle 2: PCR-Ansatz

Die PCR-Synthese erfolgte in einem
20 µl-Reaktionsansatz

5

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
cDNA	6 µl	
10x PCR-Puffer*	5 µl	1x
dNTP-Mix	1 µl	jeweils 200 µM
Primer	(s. Tabelle 3)	
Q-Solution***	10 µl	
Taq-DNA Polymerase **	0.5 µl	2.5 U
H ₂ O	ad 50 µl	

* enthält 15 mM MgCl₂

** HotStar Taq™ DNA Polymerase, Fa. Qiagen, Hilden

*** Q-Solution; Fa. Qiagen, Hilden;

(Der Zusatz von Q-Solution ist zum Nachweis von GCAP/PLAP notwendig).

10

Als Primer wurden die in der folgenden Tabelle 3 zusammengefaßten PCR-Primer eingesetzt.

15

Tabelle 3: Liste der PCR-Primer

Primername	Sequenz 5'→ 3'	PCR- Produkt
Tumormarker		
GCAP/PLAP sense	GCCACGCAGCTCATCTCCAACATG	440 bp
GCAP/PLAP antisense	ATGATCGTCTCAGTCAGTGCCCGG	
GA733_2 sense	AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA	395 bp
GA733_2 antisense	TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA	
HMGI-sense	AAAGGCAGCAAAAACAAGAGTCCC	213 bp
HMGI-antisense	CCAAGTGCTGCTGAGGTAGAAATC	
GRPR sense	TCTCCCCGTGAACGATGACTGGTC	308 bp
GRPR antisense	TGAAGACAGACACCCCAACAGAGG	
Interne Kontrolle		
β-Aktin sense	CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT	111 bp
β-Aktin antisense	ACAGGACTCCATGCCCAGGAAGGA	

5

Diese Primer wurden in den in Tabelle 4 aufgelisteten Mengen und Kombinationen eingesetzt, die dort spaltenweise aufgeführt sind.

10

Tabelle 4: Auflistung der Primermengen und Primerkombinationen

Marker Primer	GCAP	GA733_2	GCAP GA733_2	HMGI- C	GRPR	GCAP GA733 HMGI-C GRPR
GCAP/PLAP sense	500 nM		800 nM			800 nM
GCAP/PLAP antisense	500 nM		800 nM			800 nM
GA733 2 sense		500 nM	300 nM			300 nM
GA733 2 antisense		500 nM	300 nM			300 nM
HMGI-C sense				500 nM		500 nM
HMGI-C antisense				500 nM		500 nM
GRPR sense					500 nM	500 nM
GRPR antisense					500 nM	500 nM
β -Aktin-sense	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM
β -Aktin-antisense	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM

5 Die Multiplex-PCR wurde unter den in Tabelle 5 angegebenen Bedingungen und bei den in Tabelle 6 angegebenen markerspezifischen Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen durchgeführt. In Tabelle 5 ist die Annealingtemperatur mit x angegeben, wobei dabei je-

10 () weils die entsprechende Annealingtemperatur aus Tabelle 6 verwendet wurde.

Tabelle 5: PCR-Bedingungen

15

Vorabdenaturierung	95 °C	15 min
Zyklus		
1. Denaturierung	94 °C	1 min
2. Annealing	x °C	1 min (s.Tab.6)
3. Extension	72 °C	1 min
Finale Extension	72 °C	10 min
	4 °C	Pause

Tabelle 6: Marker-spezifische Annealingtemperatur und Zyklenzahl

Marker	GCAP	GA733 2	HMGI-C	GRPR	GCAP GA733_2	GCAP GA733 2 HMGI-C GRPR
Annealing-Temperatur	58°C	56°C	57°C	60°C	58°C	58°C
Zyklenzahl	40	40	40	40	40	40

1 µl des so erzeugten PCR-Produktes wurde in einem Agilent Bioanalyzer 2100 auf einem DNA-Chip 500 aufgetrennt und das Trennergebnis elektrophoretisch dokumentiert.

Fig. 1 zeigt das Ergebnis eines Nachweises mittels Elektrophorese unter Einsatz eines DNA-500-Chip (Agilent) und eines Agilent Bioanalyzer 2100. Spur 1 zeigt eine 100 bp-Leiter, Spur 2 eine cDNA-Kontrolle ohne RNA im Ansatz, Spur 3 eine PCR-Kontrolle ohne cDNA im Ansatz, Spur 4 eine Negativkontrolle für GCAP/PLAP mit RNA einer gesunden Kontrollperson im Ansatz und Spur 5 die Probe einer erkrankten Person.

Die Kontrollmessung von β -Aktin ist lediglich bei den beiden realen Blutproben der Spuren 4 und 5 positiv, während lediglich Spur 5 die zu erwartende Bande für GCAP/PLAP als Hodentumormarker aufweist.

Ein weiteres Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt. Der Nachweis erfolgte dabei ebenfalls mittels eines Agilent Bioanalyzer 2100 und einem DNA-500 Assay-Chip von Agilent. Die Spuren 1 bis 6 zeigen dabei eine Multiplex-PCR der cDNA von GCAP und GA733.2 und die Spuren 7 bis 13 eine Multiplex-PCR der cDNA von GCAP, GA733.2, GRPR und HMGI-C. Die Bezeichnungen cDNA-

Kontrolle, PCR-Kontrolle und Negativ-Kontrolle bezeichnen Proben ohne RNA, ohne cDNA bzw. mit RNA einer gesunden Kontrollperson. Es ist in den Spuren 5, 9 bzw. 13 zu erkennen, daß lediglich die Proben an Hodentumor erkrankter Personen im Nachweis der cDNA und damit der mRNA für GCAP/PLAP, GA733.2, GRPR und HMGI-C positiv sind.

Damit ist gezeigt, daß die entsprechenden Hodentumor-marker wie beschrieben und beansprucht, nachgewiesen werden können.

Alternativ zu den hier dargestellten Methoden können selbstverständlich auch herkömmliche Analysemethoden wie Agarose-Gelelektrophorese angewandt werden, bei denen beispielsweise 25 µl des oben dargestellten PCR-Produktes über ein 2,5%iges Agarosegel aufgetrennt werden und die DNS-Banden anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation kann beispielsweise mit Hilfe des DUO Store Systems der Fa. Inta durchgeführt werden.

() Auch eine Fragmentanalyse mittels ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt) kann zur Auswertung verwendet werden. Hierzu wird eine PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern durchgeführt und anschließend beispielsweise jeweils 1 µl des jeweiligen PCR-Produktes in einer Verdünnung von 1 : 50 eingesetzt.

Als weiterer Nachweis ist ein Nachweis mittels sequenzspezifischer fluoreszenzmarkierter Hybridisierungsproben möglich, die nach jedem Zyklus der PCR die Produktentwicklung verfolgen lassen. Anhand spezieller Standards kann dann auch ein Rückschluß auf die Menge an Ausgangs-RNS gezogen werden. Als Alter-

native zur Block-PCR kann der Tumormarkernachweis auch mittels Echtzeit-PCR unter Verwendung DANN-interkallierender Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen (z.B. LightCyclerTM und CybrGreenTM der Fa. Hoffmann-Roche). Dazu erfolgt beispielsweise eine Quantifizierung über fluoreszenzbasierte Echtzeit-PCR. Hierzu wird dem PCR-Ansatz eine sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Hybridisierungsprobe zugesetzt, durch die nach jedem Zyklus der PCR mittels der von ihr emittierten Fluoreszenz die Produktentwicklung, d.h. die Amplifikation, verfolgt werden kann. Anhand spezieller Standards können dann Rückschlüsse auf die Mengen an Ausgangs-RNS gezogen werden. Damit ist auch eine Quantifizierung der in der Blutprobe vorliegenden Hodentumor-assoziierten RNS und folglich eine direkte Aussage über das Ansprechen auf eine gewählte Therapiemethode möglich. Dieses Verfahren kann beispielsweise mit einem Light-CyclerTM der Firma Roche, Basel oder einem Taq-ManTM der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt, wie es bereits hinlänglich aus der Literatur bekannt ist, durchgeführt werden.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren es weiterhin ermöglichen, die wie oben beschriebenen sortierten und separierten Zellen anschließend beliebig weiter zu verwenden. Beispielsweise können diese in ein geeignetes Zellkulturmedium eingesetzt und in situ kultiviert werden.

Da die Zellen nach der Trennung intakt sind, bleiben auch die Eigenschaften der Zellmembran und des Zellkerns erhalten. Dies eröffnet die Möglichkeit, mikroskopisch die Expression weiterer Oberflächenmarker untersuchen oder auch Chromosomen-Analysen durchzuführen. Die sortierten Zellen werden dazu auf Objekt-

5 träger aufgebracht. Der Nachweis weiterer Oberflä-
chenmarker kann chytochemisch oder über Fluoreszenz-
mikroskopie erfolgen. Ebenso können genetische Analy-
sen durchgeführt werden, wie beispielsweise Chromoso-
menanalysen mittels FISH (Fluorescence in situ hybri-
disation) oder Karyogramm-Erstellung.

()

Patentansprüche

- 5 1. Diagnose-Kit zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Hodentumoren mit
- mindestens einem Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer),
- 10 wobei die beiden Oligonukleotide des Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind, und
- wobei der gesuchte DNS-Abschnitt Teil der cDNS
- 15 zu einem der Tumormarkerproteine plazenta-spezifische alkalische Phosphatase (PLAP), keimzell-spezifische alkalische Phosphatase (GCAP), epitheliales Glykoprotein 40 (GA 733.2 bzw. EGP 40), high-mobility group protein isoform I-C
- 20 () (HMGI-C) und/oder Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) ist.
2. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens zwei
- 25 Paare Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer) enthält,
- wobei die beiden Oligonukleotide der jeweiligen Paare als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden
- 30 komplementären Stränge verschiedener gesuchter DNS-Abschnitte geeignet sind, und

wobei die gesuchten DNS-Abschnitte jeweils Teil der c-DNS zu verschiedenen Tumormarkerproteinen ausgewählt aus den Tumormarkerproteinen plazenta-spezifische alkalische Phosphatase (PLAP), keimzell-spezifische alkalische Phosphatase (GCAP), epitheliales Glykoprotein 40 (GA 733.2 bzw. EGP 40), high-mobility group protein isoform I-C (HMGI-C) und/oder Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) sind.

3. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein weiteres Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer) enthält,

wobei die beiden Oligonukleotide des Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion der Reaktionsprodukte einer Polymerasekettenreaktion mit einem der anderen Oligonukleotidpaare geeignet sind.

4. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein weiteres Paar Oligonukleotide enthält, die jeweils als Primer zur Amplifikation zumindest eines Abschnitts eines der beiden komplementären Stränge der cDNS zu dem Protein β -Aktin als interne Kontrolle geeignet sind.

5. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Oligonukleotide eines Paares paarweise die folgenden Sequenzen aufweisen:

5 GCCACGCAGCTCATCTCCAACATG und
ATGATCGTCTCAGTCAGTGCCCGG; und/oder

AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA und
TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA; und/oder

10 AAAGGCAGCAAAAACAAGAGTCCC und
CCAACTGCTGCTGAGGTAGAAATC; und/oder

15 TCTCCCCGTGAACGATGACTGGTC und
TGAAGACAGACACCCCAACAGAGG.

6. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest jeweils eines der beiden Oligonukleotide eines Paares von Oligonukleotiden mit Fluorophoren markiert ist.

- 20 ()
7. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide verschiedener Paare mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind.

25

- 5 8. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Amplifikation der cDNS zu β -Aktin ein Paar Oligonukleotide mit den folgenden Sequenzen enthält:
CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT und
ACAGGACTCCATGCCCAGGAAGGA.
- 10 9. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest jeweils eines der beiden Oligonukleotide des Paares zur Amplifikation der cDNS zu β -Aktin mit Fluorophoren markiert ist.
- 15 10. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid mit folgender Sequenz
CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT
mit dem Fluorophor
20 4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein markiert ist.
- 25 11. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen enthält.

- 5 12. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderliche Substanzen eine Pufferlösung, Magnesiumchlorid, Desoxynukleotid-Triphosphate sowie eine hitzestabile Polymerase enthält.
- 10 13. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es als hitzestabile Polymerase eine Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) enthält.
- 15 14. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Positivkontrolle eine DNS-Probe mit dem jeweils gesuchten DNS-Abschnitt enthält.
- ()
- 20 15. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Anleitung zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion und/oder eine Anleitung zur Durchführung einer Fragmentanalyse enthält.
- 25 16. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Schema zur Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse enthält.

- 5 17. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Mikroarray (DNS-Chip) enthält, wobei der Array eine Anzahl voneinander getrennter Zellen (Felder) aufweist und in mindestens einer Zelle des Mikroarrays ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit dem gesuchten DNS-Abschnitt hybridisiert.
- 10 18. Diagnosekit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer weiteren Zelle des Mikroarrays ein weiteres Oligonukleotid angeordnet ist und die Sequenz des Oligonukleotids, das in der mindestens einen Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotides unterscheidet.
- 15 19. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligonukleotide jeweils mit verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.
- 20 20. Mikroarray zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Hodentumoren, beispielsweise DNS-Chip, mit einer Anordnung von mehreren, voneinander getrennten Zellen, dadurch gekennzeichnet,
- 25 30

net, daß in mindestens einer Zelle ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit einem DNS-Abschnitt hybridisiert, der Teil der cDNS zu einem der Tumormarkerproteine, plazenta-spezifische alkalische Phosphatase (PLAP), keimzellspezifische alkalische Phosphatase (GCAP), epitheliales Glykoprotein 40 (GA 733.2 bzw. EGP 40), high-mobility group protein isoform I-C (HMGI-C) und/oder Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) ist.

21. Mikroarray nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß in zwei bis vier Zellen jeweils verschiedene Oligonukleotide angeordnet sind, die mit jeweils zwei bis vier verschiedenen DNS-Abschnitten, die Teil der cDNS von jeweils verschiedenen Tumormarkerproteinen ausgewählt aus den Tumormarkerproteinen plazenta-spezifische alkalische Phosphatase (PLAP), keimzellspezifische alkalische Phosphatase (GCAP), epitheliales Glykoprotein 40 (GA 733.2 bzw. EGP 40), high-mobility group protein isoform I-C (HMGI-C) und/oder Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) sind, hybridisieren.

22. Verfahren zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Hodentumoren bei einem Menschen, dadurch gekennzeichnet, daß in einer Blutprobe des Menschen das Vorhandensein oder Fehlen von mRNS erfaßt wird, die für mindestens eines der Tumormarkerproteine plazenta-spezifische alkalische

5 Phosphatase (PLAP), keimzell-spezifische alkali-
sche Phosphatase (GCAP), epitheliales Glykoprotein 40 (GA 733.2 bzw. EGP 40), high-mobility
group protein isoform I-C (HMGI-C) und/oder Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) kodiert
und daraus auf das Vorhandensein von Tumorzellen
in der Blutprobe und damit auf mögliche Metastasierung geschlossen wird.

10 23. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die mRNA in herkömmlicher Weise unmittelbar aus der Vollblutprobe isoliert wird.

15 24. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß anschließend an die Isolation der mRNA ein DNS-Verdau durchgeführt wird.

()

20 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die RNS-haltigen Bestandteile der Blutprobe zuerst aufkonzentriert werden und anschließend diese Fraktion untersucht wird.

25

26. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der RNS-haltigen Bestandteile mindestens eine Zentrifugation der Blutprobe zur Pelletierung

der in ihr enthaltenen Leukozyten durchgeführt wird.

- 5 27. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der RNS-haltigen Bestandteile eine Lyse darin enthaltener Erythrozyten durchgeführt und anschließend die nichtlysierten Leukozyten als Fraktion pelletiert und für die weitere Diagnose gewonnen werden.
- 10
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der RNS-haltigen Bestandteile mindestens eine
- 15 Dichtegradienten-Zentrifugation der Blutprobe zur Abseparierung und Gewinnung der in ihr enthaltenen mononuklearen Blutzellen durchgeführt wird.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß zur Separation von Hodentumorzellen die Zellen mit gegen Tumorzellen oder Hodentumorzellen gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und mittels
- 20 fluoreszenzassoziierter Zellsortierung (FACS) von der Probe abgetrennt und gewonnen werden.
- 25
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß zur Separation von Tumorzellen oder Hodentumorzellen die Zellen mit
- 30

magnetischen Partikeln in Kontakt gebracht werden, auf der Oberfläche gegen Tumorzellen oder Hodentumorzellen gerichtete Antikörper immobilisiert sind und die magnetischen Partikel anschließend abgetrennt werden.

- 5
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die mononuklearen Zellen der gewonnenen Fraktion lysiert und die mRNS abgetrennt wird.
- 10
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnene mRNS in cDNS revers transkribiert wird und anschließend das Vorhandensein oder Fehlen der cDNS erfaßt wird, die dem Tumormarkerprotein zugeordnet ist.
- 15
- () 33. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein vorbestimmter Abschnitt der cDNS durch Polymerase-Kettenreaktion ("PCR") bzw. verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion ("nested PCR") vervielfältigt wird.
- 20
- 25
34. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Vervielfältigung der cDNS eines oder mehrere Oligonukleotid-Paare verwendet werden, die die folgenden Sequenzen aufweisen:
- 30

GCCACGCAGCTCATCTCCAACATG und
ATGATCGTCTCAGTCAGTGCCCGG; und/oder

5 AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA und
TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA; und/oder

AAAGGCAGCAAAAACAAGAGTCCC und
10 CCAACTGCTGCTGAGGTAGAAATC; und/oder

TCTCCCCGTGAACGATGACTGGTC und
TGAAGACAGACACCCCAACAGAGG.

15 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 34,
dadurch gekennzeichnet, daß als interne Kontroll-
le die mRNA des Proteins β -Aktin bestimmt wird.

20 36. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da-
durch gekennzeichnet, daß die mRNA für β -Aktin
in cDNA revers transkribiert und ein Abschnitt
der cDNA mittels Polymerasekettenreaktion ver-
vielfältigt wird.

25 37. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da-
durch gekennzeichnet, daß zur Vervielfältigung
der cDNA des β -Aktin ein Oligonukleotid-Paar
verwendet wird, wobei die Oligonukleotide des
Paares die folgenden Sequenzen aufweisen:

30

CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT und
ACAGGACTCCATGCCCAGGAAGGA.

- 5 38. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid mit der Sequenz
CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT
mit dem Fluorophor 4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein markiert ist.
- 10 39. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß der vervielfältigte cDNS-Abschnitt durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut und anhand der erzeugten cDNS-Bruchstücke das Vorhandensein oder Fehlen der
- 15 mRNS eines Tumormarkerproteins bestimmt wird.
- () 20 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten cDNS-Abschnitte eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte durchgeführt wird.
- 25 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten cDNS-Abschnitte eine Fragmentanalyse durchgeführt wird.

- 5 42. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß während des Verlaufs der Polymerasekettenreaktion die von den Produkten erzeugte Fluoreszenz erfaßt und die Produktentwicklung erfaßt wird (fluoreszenzbasierte Echtzeit-PCR).
- 10 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der mRNA oder cDNA ein Nukleotid-Mikroarray nach einem der Ansprüche 20 oder 21 verwendet wird.
- 15 44. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten cDNA das PCR-Produkt auf ein Nukleotid-Mikroarray nach einem der Ansprüche 20 oder 21 aufgetragen wird.
- ()
- 20 45. Verwendung eines Diagnose-Kits, eines Mikroarrays und/oder eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Diagnose von Erkrankungen oder Metastasierung oder zur Behandlungskontrolle bei Hodentumor.
- 25

1/2

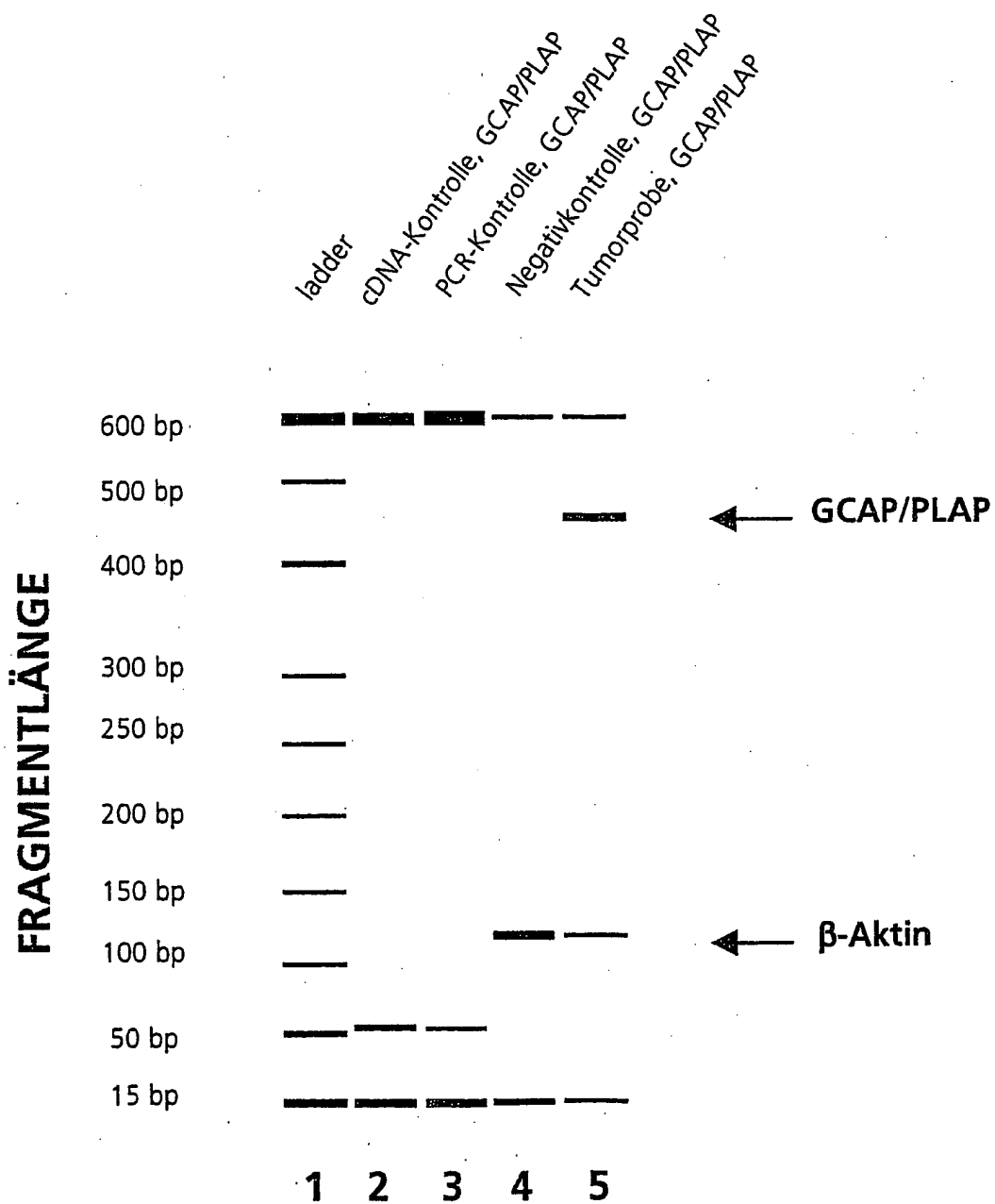


Fig. 1

2/2

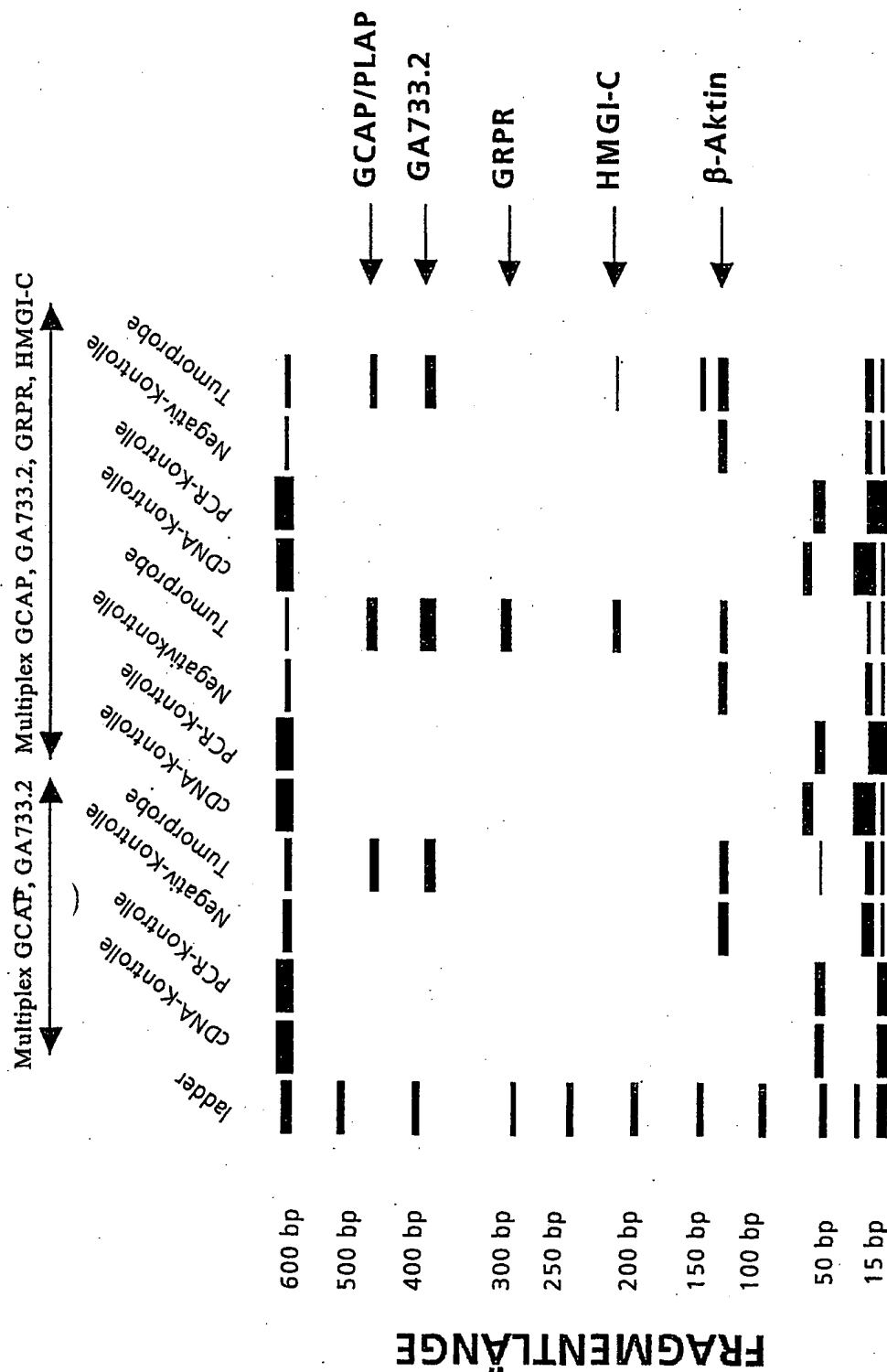


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/13606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 B01J19/00 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POTTEK T S ET AL: "Testicular Cancer: Human Placental Alkaline Phosphatase (hPLAP)" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 33, September 1997 (1997-09), page S43 XP004283438 ISSN: 0959-8049	1,3-20, 45
Y	abstract --- -/-	2,21-44

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

18 December 2002

Date of mailing of the International search report

14/01/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bradbrook, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/13606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WATANABE S ET AL: "EXPRESSION OF THE GERM CELL ALKALINE PHOSPHATASE GENE IN HUMAN CHORIOCARCINOMA CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 21, 1989, pages 12611-12619, XP002225508 ISSN: 0021-9258	1,3-20, 45
Y	abstract page 12611, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1 page 12612, column 2, paragraph 4	2,21-44
X	ZHONG X Y ET AL: "Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow." ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, vol. 263, no. 1-2, November 1999 (1999-11), pages 2-6, XP002225509 ISSN: 0932-0067	1,3-20, 45
Y	abstract page 3, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 2	2,21-44
Y	EP 0 520 794 A (HOFFMANN LA ROCHE ;UNIV CALIFORNIA (US)) 30 December 1992 (1992-12-30) cited in the application page 3, line 7 -page 11, line 52	22-44
Y ()	GHOSSEIN R A ET AL: "Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors." CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. UNITED STATES AUG 1999, vol. 5, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 1950-1960, XP002225510 ISSN: 1078-0432 page 1950, column 1, paragraph 1 -page 1951, column 2, paragraph 1 page 1956, column 2, paragraph 4 -page 1957, column 2, paragraph 1	22-44
Y	SMITH B ET AL: "DETECTION OF MELANOMA CELLS IN PERIPHERAL BLOOD BY MEANS OF REVERSE TRANSCRIPTASE AND POLYMERASE CHAIN REACTION" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 338, 16 November 1991 (1991-11-16); pages 1227-1229, XP002008751 ISSN: 0140-6736 the whole document	22-44

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/13606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS**" ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, vol. 38, no. 19, 1999, pages 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 page 2866, column 1, paragraph 2 - paragraph 3 -----	17-21, 43-45
A	FATHI ZAHRA ET AL: "BRS-3: A novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 8, 1993, pages 5979-5984, XP002225511 ISSN: 0021-9258 abstract -----	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/13606

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0520794	A	30-12-1992	
		AU 662906 B2	21-09-1995
		AU 1846592 A	07-01-1993
		CA 2072314 A1	27-12-1992
		DE 69223284 D1	08-01-1998
		DE 69223284 T2	25-06-1998
		DK 520794 T3	27-04-1998
		EP 0520794 A1	30-12-1992
		ES 2111047 T3	01-03-1998
		GR 3026153 T3	29-05-1998
		JP 5269000 A	19-10-1993
		US 5543296 A	06-08-1996
		US 5766888 A	16-06-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/13606

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 B01J19/00 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	POTTEK T S ET AL: "Testicular Cancer: Human Placental Alkaline Phosphatase (hPLAP)" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, Bd. 33, September 1997 (1997-09), Seite S43 XP004283438 ISSN: 0959-8049	1,3-20, 45
Y	Zusammenfassung --- -/-	2,21-44
()		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/01/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bradbrook, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/13606

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	WATANABE S ET AL: "EXPRESSION OF THE GERM CELL ALKALINE PHOSPHATASE GENE IN HUMAN CHORIOCARCINOMA CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 21, 1989, Seiten 12611-12619, XP002225508 ISSN: 0021-9258	1,3-20, 45
Y	Zusammenfassung Seite 12611, Spalte 1, Absatz 1 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 12612, Spalte 2, Absatz 4	2,21-44
X	ZHONG X Y ET AL: "Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow." ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, Bd. 263, Nr. 1-2, November 1999 (1999-11), Seiten 2-6, XP002225509 ISSN: 0932-0067	1,3-20, 45
Y	Zusammenfassung Seite 3, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 2	2,21-44
Y	EP 0 520 794 A (HOFFMANN LA ROCHE ;UNIV CALIFORNIA (US)) 30. Dezember 1992 (1992-12-30) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 7 -Seite 11, Zeile 52	22-44
Y	GHOSSEIN R A ET AL: "Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors." CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. UNITED STATES AUG 1999, Bd. 5, Nr. 8, August 1999 (1999-08), Seiten 1950-1960, XP002225510 ISSN: 1078-0432 Seite 1950, Spalte 1, Absatz 1 -Seite 1951, Spalte 2, Absatz 1 Seite 1956, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 1957, Spalte 2, Absatz 1	22-44
Y	SMITH B ET AL: "DETECTION OF MELANOMA CELLS IN PERIPHERAL BLOOD BY MEANS OF REVERSE TRANSCRIPTASE AND POLYMERASE CHAIN REACTION" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, Bd. 338, 16. November 1991 (1991-11-16), Seiten 1227-1229, XP002008751 ISSN: 0140-6736 das ganze Dokument	22-44

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/13606

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS**" ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, Bd. 38, Nr. 19, 1999, Seiten 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 Seite 2866, Spalte 1, Absatz 2 ~ Absatz 3</p>	<p>17-21, 43-45</p>
A	<p>FATHI ZAHRA ET AL: "BRS-3: A novel <i>bombesin receptor subtype selectively</i> <i>expressed in testis and lung carcinoma</i> <i>cells.</i>" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 268, Nr. 8, 1993, Seiten 5979-5984, XP002225511 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung</p>	<p>1-45</p>

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/13606

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0520794	A	30-12-1992	
		AU 662906 B2	21-09-1995
		AU 1846592 A	07-01-1993
		CA 2072314 A1	27-12-1992
		DE 69223284 D1	08-01-1998
		DE 69223284 T2	25-06-1998
		DK 520794 T3	27-04-1998
		EP 0520794 A1	30-12-1992
		ES 2111047 T3	01-03-1998
		GR 3026153 T3	29-05-1998
		JP 5269000 A	19-10-1993
		US 5543296 A	06-08-1996
		US 5766888 A	16-06-1998